



[12] 发明专利申请公开说明书

[21]申请号 87104512.5

[43]公开日 1989 年 1 月 4 日

[51]Int.Cl³

G01N 33/53

[22]申请日 87.6.26

[71]申请人 尤尼利弗公司

地址 荷兰鹿特丹

[72]发明人 保罗·詹姆斯·戴维斯

罗斯玛丽·安·露西·德雷克

威廉·爱德华·霍恩比

[74]专利代理机构 中国专利代理有限公司

代理人 林玉贞 曹恒兴

G01N 33/543

说明书页数:

附图页数:

[54]发明名称 一种新的免疫测定方法

[57]摘要

一种免疫测定方法，通过特异性结合定性或定量测定样品中被测物。样品与可移动的固相载体相接触。如磁性粒子（620），在其上面固定第一结合试剂，同时带有一标记试剂，在被测物存在情况下它能参与“夹心”或与第一试剂进行竞争性反应。经过孵育期足以允许发生反应。载体在试验介质中（618）移动至讯号敏感元件附近（602）。标记物持续地在试验介质中产生一种讯号，和在光敏元件附近产生的讯号大小作为结合反应发生程度的测定。最好在试验介质中掺入一种屏蔽或猝灭剂。

(BJ)第 1456 号

1. 通过特异性结合定性和 / 或定量测定样品被测物的一个测定方法。样品与可移动固相载体物接触, 例如颗粒载体。在载体上固定第一结合试剂, 它对被测物具有特异性。同时也带有标记的特异性结合试剂, 它能参与“夹心”或“竞争”反应。这是在有被测物存在情况下与第一试剂竞争。其特点是, 足以使反应发生在孵育期后。可移动的固相载体在试验介质中移至光敏元件附近, 在此处, 标记物在试验介质中不断产生一讯号, 其大小作为测量结合反应发生的程度。

2. 按照权利要求1的测定方法, 其特征在于标记物在试验介质中不断产生一讯号。当标记的结合试剂均匀分散在试验介质中时, 讯号被抑制。结合反应发生后, 粒子载体定位在一局部, 没有足够的讯号抑制能力克服局部产生的讯号, 因此, 可产生一个可测的讯号, 其性质和 / 或大小取决于被测物和定位到颗粒上的特异性结合试剂间的结合程度。

3. 按照权利要求1或2的测定方法, 其特征在于通过光敏元件测得的讯号是可见光, 来自化学发光反应。

4. 按照权利要求3的测定方法, 其特征在于在试验介质中标记物产生过氧化氢。测定过氧化物是通过它参与化学发光反应而实现。

5. 按照权利要求4的测定方法, 其特征在于标记物是过氧化物消耗酶, 它参与化学发光反应。

6. 按照权利要求1或2的测定方法, 其特征在于在试验介质中标记物产生过氧化氢, 以电化学法测量过氧化物。

7. 按照前述任何一个权利要求的测定方法, 其特征在于试验介质中掺入一屏蔽或猝灭剂, 它抑制远离讯号敏感元件的试验介质部位中产生的讯号。

8. 按照权利要求7的测定方法, 其特征在于可测的讯号是化学发光的光。屏蔽或猝灭剂使试验介质不透光或至少半透明以下, 使光不能

从远离讯号敏感元件区到达讯号敏感元件。

9 . 按照权利要求7 的测定方法，其特征在于屏蔽或猝灭试剂是一种化学试剂，它消耗讯号产生系统中主要成份。

10 . 按照权利要求9 的测定方法，其特征在于标记物在试验介质中产生过氧化氢，消耗剂是过氧化氢酶。

11 . 按照权利要求5 的测定方法，其特征在于标记物是辣根过氧化物酶，试验介质掺入一种过氧化物，如过氧化氢和一种化学发光剂2,3-二氢-1,4-二氮杂萘二酮如鲁米诺，和试验介质中必要时也可掺入使化学发光反应增强的试剂如对-碘酚、对-苯基酚和/或2-氯-4-苯基酚。

12 . 按照权利要求1 的测定方法，其特征在于试验介质中掺入：

①第一群定位粒子，其上固定对分析物有特异性的结合试剂。

②第二种特异性结合试剂，在试验介质中不断产生一种化学光反应的前体。

③消耗剂分散在试验介质中 它和上述前体进行有效的竞争，因此当标记的特异性结合试剂在试验介质中保持分散时，它抑制化学发光产生。和

④第二群定位粒子，带有或含有一种试剂，它能和上述前体起反应以产生化学发光的光。在本测定方法中，两种粒子群在光测定元件附近一起定位，能观察到一定量的化学发光，其量取决于固定在第一群粒子上特异性结合试剂结合到被测物上的多少。

13 . 按照权利要求12 的测定方法，其特征在于标记物是葡萄糖氧化酶，试验介质含有葡萄糖和一种化学发光剂2,3-二氧-1,4-二氮杂萘二酮如鲁米诺。消耗试剂是过氧化氢酶。连结到第二群定位粒子上的试剂是辣根过氧化物酶，以及在试验介质中掺入反应增加剂如对-碘酚。

14 . 按照权利要求1 的测定方法，其特征在于化学讯号的测定是

通过将一粒子载体定位在一表面附近，此表面带有或含有一试剂，它能与化学讯号互相反应。

1 5 . 按照权利要求1 4 的测定方法，其特征在于化学讯号是过氧化氢，表面是一凝胶体，它含有辣根过氧化物酶和一化学发光剂2,3-二氢-1,4- 二氮杂萘二酮如鲁米诺。同样也掺入反应增强剂如对- 碘酚。

1 6 . 按照前述任何一个权利要求的测定方法，该方法被应用于筛选细胞培养基。

一种新的免疫测定方法

本发明是涉及利用特异性结合，如免疫测定的一种检查方法。

固相，如利用粒子的免疫测定系统已为大家所知。这包括应用免疫原（被测物）和一种或几种特异性结合物之间的免疫结合反应，在一试验样本中定性和/或定量测定其中某免疫原种类，而这些结合物中至少有一种是联结到一种不溶性载体上，并与组成试验样品的液体介质接触。产生联结到载体物质上的免疫复合物这一现象对以后测定结合反应的程度有其优点。这种测定常通过应用标记特异性结合物获得，结合反应可以是“竞争性”反应或“夹心”反应，这两种反应目前已广泛应用于此领域内。

在典型的竞争反应中，试验介质一般是水溶液，它与固体载体接触，在载体上结合一特异结合物（如单克隆抗体），它对被测定物具有特异性。试验介质中含有已知量被标记的待测物（或某种类似物，它具有相同的决定簇）和一已知量疑含有待测物的样品。如样品中不含有被测物，则标记的待测物或类似物与固定在固相载体上的特异性结合试剂结合，这种结合程度可从标准实验中获得。如果样品中含有被测物，它与标记的待测物或类似物特异性竞争结合剂，使特异性结合剂和标记成份间的结合减少。以此与标准条件下，进行比较（即在无待测物情况下取得的结果），可推算出样品中待测物的浓度。

在典型的“夹心”反应中，第一种结合剂，对待测物具有特异性，被固定在固相载体上，试验介质一般也是液体，同样含有第二种结合试剂，对被测物有特异性，也被标记。在无被测物情况下，不存在被固

定的试剂和被标记试剂间的结合。当存在被测物情况下，它作为固定的试剂和标记的特异性结合试剂间的桥梁，导致标记试剂和固相间的间接结合。根据结合程度可测定样品中被测物的浓度。与被测物反应的固定和标记试剂特异性可以不同，但是，如果被测物分子具有一个以上相同的决定簇，则固定和游离标记形式的结合试剂有可能应用相同特异性。

已有若干类型的基于粒子的免疫测定方法。这些方法中某些涉及对特异性结合反应中产生的复合物的复杂测定方法和 / 或从试验介质中分离出载有复合物的颗粒状载体的一套物理方法，包括测定被检样品前，除去未结合的物质。在某实施方案中，本发明企图提供一个不需分离的颗粒的免疫测定方法。在此方法中，试验中的样品测定可以迅速、简单进行，特别是免疫测定只需一个步骤。

试验介质中固相载体颗粒需要固定的免疫测定法见于多种资料。EP0169434 中介绍一个荧光的免疫测定方法。它将一抗原附着到磁性粒子上，在测量时，这些粒子被一磁场吸到测量管的壁上。为获得测量结果，则需要在测量管外利用一能量如紫外线以激发荧光发生。

EP0149565 介绍的免疫测定法是利用一标记试剂和另一个结合到可为磁性吸附粒子上的试剂，此粒子不溶于液态试验介质中，而是悬浮其中。标记试剂处于液相和粒子之间（两者的比例取决于样品中被测物的浓度）后除去液相，将粒子重悬于另一液体介质中，再测量标记物的浓度。此方法适用于荧光和化学发光标记方法。同时很方便地在微量滴定板中应用，板中各孔可用光学方法逐个测定。观察结果可以在孔上、孔底进行。EP0149565 明确说明很难有效测得来自沉淀的任何光讯号，此种沉淀是悬液中沉下的颗粒性试剂。

在EP0149565 中介绍的发明原理，完全不同于本发明的基本原理。因为我们已发现上述观察不仅是可能的，而且确实很适合从定位的固相中而不是从分散的固相中进行有关观察。

本发明提供一个基于载体测定方法，它利用一个标记的特异结合物，它在试验介质中不断产生一种讯号。同时，在此方法中，结合反应发生后，载体物移至试验介质中某一部位，从此处可以测得任何增强了的局部讯号量。

更为特异性的是本发明利用特异性结合反应，提供对样品定性和/或定量测定被测物的方法。其中样品和可移动的固相载体结合，在载体上包被有对被测物具有特异性的第一结合试剂，样品同时也与标记的特异性结合试剂接触，此类试剂参与“夹心”或在被测物存在情况下与第二试剂产生“竞争”反应。在此方法中，经孵育一定时间足以使反应发生后，将可移动的固相载体物质在试验介质中移至一个讯号传感装置附近，标记物在试验介质中不断产生某种讯号，以传感器中讯号大小作为测量结合反应的大小。

此发明将在原则上详细介绍基于粒子免疫测定的内容。但是从下面介绍明显证明在不超出本发明主要精神的条件下，其他的实际申请也是有效的。

作为一个实施案，本发明提供一个基于粒子的免疫测定方法，它利用一种标记的特异性结合试剂，在试验介质中持续产生一个讯号。当标记的结合试剂在试验介质中均匀分布时，此种讯号被抑制。此方法中，在结合反应发生后，粒子载体物被定位在某环境中，此处不具备讯号抑制能力以抑制局部产生的讯号。因此，能产生可测的讯号，其性质和/或大小取决于被测物和被携带于粒子上的特异性结合试剂之间的结合程度。

在较好的实施案中，本发明提供一个基于粒子的免疫测定方法。它利用一标记的特异性结合物，在试验介质中能连续产生讯号，当标记结合物在试验介质中均匀分布时，产生的讯号被屏蔽、猝灭或抑制。在此方法中，结合反应发生后，在试验介质中粒子载体物的局部浓度的建立，

使被粒子携带的复杂的标记结合物的局部浓度产生局部讯号流，它足以克服试验介质局部讯号抑制能力。因此，它提供了一可测讯号，其性质和 / 或大小取决于试验条件下免疫原和粒子携带的特异性结合物间的结合程度。

在本发明的内容中，各词“讯号”是说明一种现象，包括在质和量方面能看到或测得。而名词“可测讯号”是被用于能看到或测得讯号的明显改变。例如，讯号可以是某化学物质的浓度，而可测讯号则可能是相对于某相对均匀的本底讯号（可能是零）其浓度的增加或减少。另一个可测讯号的例子是某种化学物质积累率的改变。另一可测讯号的例子可能是电磁辐射强度的改变，例如可见光，它由某种化学物质，如化学发光剂放出。

本发明的免疫测定方法具有下列特点：

①标记物在试验介质中不断产生一个讯号。

②当标记物分散在试验介质中时，不管它是游离或结合进连结到载体上的复合物中，讯号被屏蔽、猝灭或抑制。

③标记结合物与其他结合物的复合，其本身不能明显地改变由标记物产生的讯号；和

④一个可测讯号的产生，只有当与复合标记物连结的载体在试验介质中定位于一相对小的区域内才有可能。

固相，例如颗粒载体，开始进入大量试验介质后，处于试验介质具有的讯号抑制活性的影响下。接着，此固相处于某种情况下，相对摆脱介质的影响，也就少受讯号抑制的影响。固相的这种运动是唯一需要完成的一种活性，目的是产生一个可读的结果。由标记物产生的持续讯号本身能避免进一步加入试剂的要求或粒子定位后提供进一步刺激，和在最低复杂性或最少操作步骤情况下提供最大的测定敏感性。物理学上定位载体粒子的简单作用完全是为了产生可测的讯号。

当标记结合物在试验介质中被分散使其产生的讯号被抑制，这是本发明最重要的特点。其机制决定于讯号产生系统本身的性质。下述机制，只是举例说明存在着的种种可能性。大量样品中的讯号抑制作用必须被抵销，这样才能使结合物的局部浓度产生一可测的讯号。在任何系统中抑制水平可通过实验和经验测得。这是不困难的。载体物、结合的讯号产生物和游离的讯号产生物的分散混合物，代表在非定位样品中期望的浓度，此浓度是用适当的讯号抑制方法（为某种消耗剂）“滴定”的，使其讯号抑制水平足以保证在结合讯号产生物没有定位情况下没有多余的讯号产生。

标记物可能是一化学试剂，它能和存在于介质中的底物起反应产生一种化学产物。如果一旦试验介质控制在适当浓度，消耗试剂即能很快消除所有的或大部分化学产物，只要标记物在整个试验介质中保持分散，一种均匀的本底讯号（例如化学产物的绝对浓度或浓度改变率）将被维持。然而，当与连结在载体粒子上的特异性结合物产生结合反应后，粒子在试验介质的局部定位可引起化学产物的积累率明显超过在此局部消耗性试剂消除化学产物的速度。在定位粒子的附近，化学产物的增加量组成可测讯号。

当粒子载体物在试验介质中某部位定位，消耗性试剂在整个大量试验介质中必须维持均匀分散。

这种化学性抑制容易达到。如应用葡萄糖氧化酶作为标记物，葡萄糖在试验介质中作为底物，而过氧化氢酶在试验介质中作为消耗性试剂。过氧化氢酶在试验介质中的浓度被确定。在正常情况下，当葡萄糖氧化酶在试验介质中均匀分散时，通过葡萄糖氧化酶和葡萄糖间的反应产生的全部或大部分过氧化氢被过氧化氢酶立即消耗。过氧化氢的本底水平将维持恒定或缓慢地均匀地改变。然而，当携带包括葡萄糖氧化酶为标记的特异性结合物的复合物颗粒载体集中在试验介质中较小的范围内时，

积累在此处的过氧化氢量将足以消除过氧化氢酶的作用，并能测定过氧化物积累的增加率。例如利用一适当的电极能测量位于电极附近粒子载体释放的过氧化氢。在样品中可能存在的干扰性化合物，如抗坏血酸或醋氨酚，它们能产生假的电化学讯号，好象由过氧化物产生，它可被电池中的电极消耗。这可免去因保护工作电极而需要选择膜。

此外，通过与另一种试剂起进一步化学反应也可测定化学产物“讯号”。此试剂可位于某表面上或表面里。例如，连结复合物的粒子载体物定位在此种表面的附近（如一厚片、纸片、薄片或膜，或第二粒子载体），此表面含有或带有一试剂，它与“讯号”产物互相作用，并在薄膜表面或内部产生如颜色改变或发射出光。以上述过氧化氢产生系统为例，在测定装置表面可含有或带有能利用过氧化物的酶，如辣根过氧化物酶(HRP)，通过与探头表面或内部底物的氧化作用形成一种颜色。

另一种方法是选择可以应用的一标记物，它能改变试验介质的PH。如脲酶或青霉素酶，与试验介质中适当的底物（如尿素）一起时。在分散情况下，标记物的作用由于结合试验介质中PH缓冲物而被屏蔽或猝灭。但发生结合反应和携带复合物的颗粒定位后，标记物的局部浓度将引起PH改变，它抵消定位载体粒子附近试验介质的缓冲能力。这种PH变化是可测的，为可利用一个PH电极或PH试纸检测。

在另一个实施例中，感应装置是由位于管外的一个气体测定器组成，而试验则是在管中进行。此感应装置可以是一个化学场效应晶体管(Chemfet)，能测氨。它位于管壁内一气体渗透膜附近，对着它的是定位的载体物。标记物可以是脲酶，它使底物尿素转变为氨。试验介质可含有L-谷氨酸盐脱氢酶作为消耗性试剂。

另一个系统，其细节上与上述完全不同，但原理一致。它是利用化学发光剂作标记物，或能与试验介质中另外成份发生化学发光反应者作为标记物。如果标记的特异性结合物均匀分布在试验介质中时，试验介

质不透光或至少不完全透明，则不能测得发光讯号。或者试验介质含有一化学成份，它与发光系统中某成份起作用，可猝灭或抑制光讯号的产生。连结着、含有标记的特异结合物的复合物颗粒载体定位后，能产生局部光讯号，它具有足够的强度以测得。颗粒载体可定位于接近盛有试验介质管壁上的“窗”或一个光敏探测元件。在试验液体内放一个（第二个）光敏探测元件可以测量本底光强度，这用于测量时校正。

如用辣根过氧化物酶作为标记，与介质中的鲁米诺（氨基苯二酰肼）和过氧化物（如 H_2O_2 ）组成此系统。介质中含有一染料，其化学性质不活泼，不受氧化反应影响，给予介质以一定波长的光密度。此光密度足够高（O.D. 值最好至少在2左右），使由分散标记物产生的光和从标记物局部浓度产生的光比较起来微不足道。在EP0165072中介绍的染料（衰减剂）的应用，它能吸收某些波长的光，包括以光反应作为标记的免疫测定中放出的光。另一方面，试验介质中可含有一种化学试剂，它干扰光的产生。

另一个方法是在样品中含有猝灭剂，它能减少或消除大量试验样本中化学发光讯号。例如用辣根过氧化物酶作为标记，在溶液中它和过氧化物和鲁米诺反应产生可见光。但如在样品中掺入一竞争剂如没食子酸或硫代二羟基乙酸，则此反应可被抑制。

加入荧光系统可能是有优越性，它能吸收化学光和放出不同波长的光，这有助于在大量样本中屏蔽所产生的光效应，特别是如果发出的光是通过合适的滤片进行观察。例如从鲁米诺放出的蓝光能被香豆素吸收，后者放出黄/绿色光。荧光增白剂能定位于或接近讯号敏感元件上，另外它又可作为一标记试剂分散在样品中，因此只能看到局部产生的化学荧光。

虽然鲁米诺（5-氨基-2,3-二氢-1,4-二氮杂萘二酮）在本发明中是一特别有用的化学光剂，但仍还有其他许多化合物和反应可被利用。

如2,3-二氢-1,4-二氮杂萘二酮的其他衍生物，象应用6-氨基衍生物（异鲁米诺）。另外的例子是荧光素和吖啶鎓酯，这些系统在GB1552607，GB2112779A和GB2095830B中有总的介绍。一般说来，化学荧光反应趋向于短寿命，这导致试验过程中时间上感到紧张。因此，提高光发射的有效供应是有用的。例如通过加入延长或延迟光发射的试剂，提高化学荧光反应，可应用某些化合物如取代的6-对羟苯噻唑、对碘酚、4-苯基酚和/或2-氯-4-苯基酚和芳香族胺，这些已在EP87959、EPI16454和GP2162946A中介绍。其中应用对碘酚更为优越。

本发明中一个重要的实施例是粒子包被试验方法，它利用一特异性结合物，用试剂标记，它参与化学发光反应。对于化学发光反应的其他主要试剂大量地存在于试验介质中，这种化学发光反应在试验介质中持续发生，当标记化合物在试验介质中均匀分布时，所产生的光被屏蔽或猝灭。在此方法中，结合反应发生后，颗粒载体物质的局部浓度在监测元件附近的试验介质中形成。这样，颗粒携带的复杂标记结合物的局部浓度产生一局部光发射，此光量以克服试验介质的局部屏蔽或猝灭能力。于是就提供一个可测讯号，它的性质和大小取决于结合程度。此种结合发生在试验中的样品和颗粒携带的特异性结构物之间。

一个本发明中进一步的实施方案是颗粒包被测定方法，它利用：

①定位颗粒（如磁性粒子）的第一部份带有一种特异性的结合物，它的特异性是针对试验中的化学样本。

②一种标记的、携带特异性结合物的非颗粒成份，这种结合物在试验介质中持续产生一种化学发光反应的前体。

③一种消耗性试剂分散在试验介质中，它与上述前体竞争。因此当标记的特异性结合物在试验介质中保持分散时，抑制化学发光反应。

④第二群定位粒子，带有或含有一种试剂，它能与上述前体起反应产生化学荧光。在上述方法中，两群粒子在一个光测定元件附近一起定

位。能观察到化学发光，其程度则决定于在试验过程中样品结合到第一群粒子携带的特异性结合物的结合程度。

在前述的实施例中，标记物可以是葡萄糖氧化酶，在试验介质中它和葡萄糖及氧起反应，产生过氧化氢作为前体。消耗性试剂可以是过氧化氢酶，结合试剂可以是辣根过氧化酶，它与鲁米诺在试验介质中互相反应。如果另有要求，结合试剂可携带在第二群颗粒表面或包裹在其中。

在试验介质中有次序地加入化合物可能是有利的。例如允许有足够的时间（孵育）在加入底物前产生免疫结合反应。此底物对标记物产生讯号是需要的。这时，只有加入必需的底物时，标记物才连续产生讯号。这种加入经常在固相再定位到介质中可测区前进行。讯号产生的持续性必须至少维持在固相定位和检测所产生讯号期间。

发生特异性结合反应所需的孵育期取决于许多因素，如试剂的性质和被测物相对和绝对的浓度以及某些物理因素如温度。这些参数对此领域内的技术人员是很熟悉的。一般讲，孵育期不超过1小时左右。在实际情况下多数是30分钟至1小时。

载体物质的定位可从许多途径达到：

一个简单的方法是让粒子在重力作用下沉淀。虽然当结合反应发生时，必须使试验介质中的粒子保持均匀悬浮。如通过搅拌、离心可替代重力作用。另一种选择也可使粒子在大量试验介质通过一渗透膜或滤纸而定位。这样处理后的粒子定位于小容积介质内。另有一种方法是在磁场或另一外力作用下，粒子载体在大量试验介质中被迫进入一特殊部位。粒子能依靠一种由超声产生的推动波而在介质中移动。

固相可用任何合适的载体材料制成。所谓各种适当大小的“磁性”粒子（即粒子在磁场作用下能在液体中移动），其大小从小于 $1\ \mu$ 至大于 $300\ \mu$ 左右，皆可从商业系统买到。用于重力分离，粒子大小最为至少在 $50\ \mu$ 左右，不大于 $300\ \mu$ 。这取决于物质的密度。市场上买到的环

氧乙烷丙烯珠非常适合，尤其对试验中标记的半抗原。对于敏化和 / 或结合固相载体至结合试剂的技术，如结合免疫球蛋白皆是在此领域内的标准技术。不属于本发明范围。

应用本发明测量的物质范围很广。举例如下：类固醇激素，包括怀孕期间或影响生育力激素，如黄体酮和雌激素。尿中代谢产物，如雌酮-3- 葡萄糖苷酸和孕二醇-3- 葡萄糖苷酸。肽激素如人绒毛膜促性腺激素，黄体素和滤泡刺激素。蛋白如尿白蛋白， β -2- 微球蛋白和维生素 A 结合蛋白。高和低密度的脂蛋白，这些物质的测定对心血管监测和心脏肌钙蛋白的测定是有价值的。感染性疾病的指标如风疹抗体，弓浆虫属 (*Toxoplasma*) 抗体。免疫球蛋白如单克隆抗体。

试验介质可有许多来源，尤其是体液如尿、血清和血浆。本发明尤其适用于免疫球蛋白的细胞培养液的筛选，如制取单克隆抗体。

特异性结合物可能是多克隆或单克隆抗体或抗原、丝裂原、激素以及它们的受体。这些物质在本领域内众所周知。许多是商品，它们准确的性质不属本发明内容。

如果含有被测物的样本具有可变的性质（如血清和尿）或含有干扰特异性结合反应的成份或带有可测量讯号的产物，将样品稀释可能对测量有利。例如应用本发明试验方法前，用水或缓冲液进行稀释，可减少这种干扰的可能性。

按照本发明可组装一个试验箱。如可反复使用的电池或电池组，并加之一套讯号敏感元件（如电极），或一个一次性的电池或装有一片膜的电池组。通过膜讯号可通过至一能重复利用的光敏元件，或整个可随时处理的电池以及讯号敏感元件组。合适的试剂，如固相和其他主要原件，需要时同样也可采用。

本发明的各个侧面通过下面实施例加以说明。

实例 1

利用装置说明本发明的原理，见附图中图1所示。

装置中有一个小箱101(图中画成矩形，尽管在实际应用中外形是无关紧要的)，它盛有一定容积102的液体试验介质，装置在箱101一侧内壁上的是铂箔电极104。电极104是通过一连接器105连到极谱分析仪上(未画)，它位于箱101的外面。从箱101开口的顶端106浸入试验介质102是一铂计数电极107和一个银/氯化银参考电极108。搅拌器109有助于物质在箱内分散。一个可移动的棒状磁铁110可随意置于箱101外电极104附近。

铂箔电极104可接0.7伏电压，这样它能测过氧化氢。

如果试验介质含有的带有免疫结合物中的一方的磁性微粒，当粒子均匀分散在试验介质中时，结合反应就会发生。以及，通过引入磁铁110，磁性粒子被定位在测定电极104附近。

应用上述装置，即可进行下面实验。

材料和方法

固相：磁性粒子制备方法如pourfarzaneh等介绍(生物化学分析方法，1982 28,267-295)，通过高碘酸氧化产生表面醛基，它与购买的抗生物素蛋白结合。这可用悬在12.5毫升蒸馏水中的经洗涤的粒子与在5毫升蒸馏水中的400毫克高碘酸钠互相作用而获得。这种制备需在室温避光条件下在头尾颠倒混合器上反应1小时。除去剩下的高碘酸溶液，氧化的颗粒再用蒸馏水洗两次和PH为9的硼酸盐缓冲液洗三次。再加入25毫升溶于硼酸盐缓冲液(PH9.0)中的抗生物素蛋白(2毫克/毫升)。这种结合反应在室温下在上述混合器反应1小时。再除去未结合的抗生物素蛋白。将粒子用硼酸盐缓冲液冲洗5次。为消除残余的醛基，首先用过量的氢化硼钠还原(此物同样能稳定抗生物素蛋白—纤维素连结)随后与0.1毫升乙醇胺在PH9.0时起反应。最后将粒子悬于磷酸盐缓冲液中，此缓冲液含0.15%“吐温-20”(PBST)，25毫升缓冲液中含

500 毫克粒子。在操作的每个阶段，皆用磁铁分离法从粒子中除去试剂溶液及冲洗液。在以后应用时，当样品回收前，这种贮备制剂应立即强力旋转以保证粒子的匀悬浮。

结合物：生物素化葡萄糖氧化酶从商业系统购得，是冷冻保存的干粉，每毫克蛋白中含20毫微摩尔生物素。它如介绍的方法那样，在用前立即稀释至PBST中重新制备。

过氧化氢酶：从商业系统购得的牛肝过氧化氢酶是一纯粉。每天制备新鲜的溶于PBS 中的工作液。

生物素：购得的d-生物素是一结晶固体，要制备合适浓度的溶液，是用正确称量的生物素溶解在PBS 中作参考溶液，稀释而成。

反应介质：粒子、结合物和样品悬浮在PBS 中。PBS 含葡萄糖1.0 毫克/毫升和过氧化氢酶2.5 微克(约25单位/毫升)。所有的溶液和反应物中皆无叠氮钠。

测定方法：生物素-葡萄糖氧化酶结合物溶液是用100 微升重建储存液在10毫升PBST中制备所得(产生最多结合物-结合讯号)或10毫升PBST含有100 微克游离生物素(产生最小完全抑制的讯号)制成。在上述溶液100 微升中加入100 微升储备的抗生物素蛋白-磁性粒子悬液。至少10分钟后(允许结合)，将产生的混合物放入盛有3.8 毫升反应介质的电化学池内。此时，接通极化图形分析器和记录仪，监测到达电极的 H_2O_2 量。一旦基线成水平，即加用磁场，利用其吸引作用将粒子收集到电极表面。移去磁场和搅动溶液，粒子脱离电极再次进入悬液。

结果：图2 线 A说明一典型的迹线，它是利用极化图形分析仪获得。引用磁场后(点201)，反应很快上升约0.4 μA 。说明过氧化物在电极附近明显增加。于点202 移去磁场，粒子很快分散到试验介质中。因此反应明显下降到本底水平点203。在此点后以均匀缓慢的速率上升，这和过氧化物在试验介质中逐渐堆积有关。因为过氧化氢酶不能完全分解

过氧化物。点204 是再次将磁铁引入，取得相同的反应，上升至点205 。后再除去磁铁，反应再次回到本底水平。只是比以前的水平略有升高。虽然反应池内 H_2O_2 的产量从总的来讲是相同的，但结合到固相的结合物不对称分布和在测定点上的固相定位，导致到达电极的 H_2O_2 的比例明显增加，可为电极测定。

当试验介质含有过量游离未标记的生物素时，可获得一完全不同的迹线（线 B）。这种对抗生物素蛋白成功的竞争，使磁铁粒子大部分携带一复合物，它几乎不含有葡萄糖氧化酶标记的生物素。在此情况下，电极测得的过氧化物本底水平在实验期间明显下降。在测定电极附近磁性粒子的定位不引起任何明显的过氧化物堆积。这是由于标记的生物素在试验介质中大部分仍保持分散状况。因此，产生 H_2O_2 的葡萄糖过氧化物酶的分布保持对称，不管粒子的定位如何。

实施例2

在此系统中，除电极的形状和排列外，所有试剂，溶液和方法皆与实施例1 相同。一根铂线放入乙酸纤维素的丙酮溶液中。当取出此铂丝，在铂线整个浸入部位复盖一层溶液，让丙酮蒸发，则在铂线上复盖有一层含乙酸纤维素的均匀膜。它成为一屏障，允许 H_2O 通过，不让其他分子通过。

上述被复盖的线用聚苯乙烯粘合剂粘至反应池的一顶角，通过此种安排，利用置于箱角外的磁铁的一极将粒子吸到极上，这样，粒子就在电极周围聚集。

以实施例1 相同的方式，反复用实验证明最大和最小结合效应。除反应值稍高外，结果相似。这可能是由于电极和携带酶的粒子间的互相作用更有效，尽管电极的表面积较小和乙酸纤维素膜的干扰。

实施例3

此实施例说明以重力作用定位粒子。

所用装置是稍加改良的Rank氧电极。以横断面正视图形式如图4加以说明。组成中有一个垂直的圆柱体式水套筒401,在顶端402完全开放,在底部403是部分开放。通过水套筒内壁405的环形附加部件404使底部403部分关闭。留下一个中央性圆孔406。水套筒401有一外凸缘407,它围绕其外壁409的底部408周围。同时,水套筒直接固定于圆柱形底座411的顶面410。水套筒401和基底411利用一外环412牢固地连在一起。此环与底座411外侧414的相应螺纹区接合而固定。同时有一环形边缘415。固定在水套筒凸缘407上。底座411的下面中央部分有一凹处,容纳一个磁性搅拌装置417。

在底座411上表面的中央是一个铂钮扣电极418,它装配于装置内,位于水套筒401的部分关闭底部403的中央孔406内。一个电连接器419来自电极418通过底座411至一多形极化分析器上(图上未画出)。一个银环形电极420与铂电极418同轴安装在底座411上,但互相间有距离。在此装置中,环形电极420位于环形附加部件404的下面。为了使环形电极420容易与箱421中液体接触,(由水套筒401和底座411形成),在环形附加部件404内开有许多孔422,其中2个孔见于图3。第二个电连接器来自环形电极420,通过底座411。膜424(来自标准的实验室透析膜)被压在水套筒401和底座411间,并盖住两个电极。

电磁搅拌器的棒425在水套筒内的箱421内,用搅拌器头417进行启动。

材料和方法

固相是连结到从商业系统购来的环氧活化琼脂糖(直径10至180微米)的来自鸡蛋蛋白的抗生物素蛋白,每毫升含有 $1-2 \times 10^6$ 个粒子,每毫升能结合20微克生物素。

结合物、过氧化氢酶和生物素与实施例1中应用一致。

试验介质用在1毫升磷酸缓冲盐溶液(PBS)中加50微升抗生物素蛋

白-琼脂糖制备。PBS 中含有结合物和生物素溶液。在室温下解育。每次实验中，将25微升预先解育的胶 / 结合物 / 生物素溶液加至2.5 毫升含有5 毫克 / 毫升葡萄糖和10微克过氧化氢酶的PBS 中。这在总数上与10微升胶和1.25葡萄糖氧化酶相等，需不断搅动溶液，当基线H₂O₂ 浓度建立时，将磁性搅拌器棒移开后，测量局部讯号。将磁棒放回以再次搅拌粒子，使各种成份再分配。每当移去磁棒，粒子很快沉淀在复盖在电极的膜上。

一个曲型的实验迹线在图3 中阐明。

当搅拌器工作时，用铂电极测得的过氧化氢稳定状态，通过水平基线301 表示。点302 是将磁搅拌棒从反应池中移去，在重力作用下，粒子载体立即沉淀。在铂电极附近过氧化氢立即开始积累，反应上升很快。点303 处，将搅拌棒再放进箱反应地中，粒子也随即分散。后反应很快下降至原来基线304 处。下述循环说明当搅拌棒相继移去或放入时，其效应很易被重复。

三次测量的平均结果见于下表1。

表 1

样 品	H ₂ O ₂ 毫微摩尔 / 分速率
10 微克 / 毫升生物素	0
1 微克 / 毫升生物素	23.7
100 毫微克 / 毫升生物素	125.9
10 毫微克 / 毫升生物素	145.3
无生物素	174.2

实施例4

本实施例说明以雌酮-3- 葡萄糖苷酸(E3G) 作为被测物进行测定。

所用仪器除本处用一机械的顶端驱动的搅拌器代替上述磁性搅拌器外，其余皆与实施例3 中所用相同。电极由一个复盖全部反应池底表面

的扁平圆盘白金工作电极和一个白金计数电极以及一个银 / 氯化银参考电极组成。后两个电极皆从箱顶引入箱中。

固相：环氧乙烷丙烯珠（环氧活化）从商业系统获得。将免抗小鼠血清的IgG 结合到此珠上。将此连结抗体的珠储存在PH7.1 的磷酸缓冲盐(PBS) 溶液中。

结合物：利用改良的SPDP法将E3G 结合到葡萄糖氧化酶上。其中葡萄糖苷酸的羧基被与吡啶基硫酸胺的衍生物和水溶性碳化二亚胺间的反应活化。生成的结合物能与针对E3G 的单克隆抗体反应，同时保留葡萄糖氧化酶的大部份活性。它在PBS 中4 °C 下贮存。需要时每天稀释成工作浓度。

单克隆抗体：以常规的方法用E3G/BSA 结合物作为免疫原制备针对游离E3G 具有特异性的小鼠单克隆抗体。杂交瘤细胞生长在无血清的培养基中，单克隆抗体的分离利用离子交换层析法。

过氧化氢酶：购得的牛肝过氧化氢酶是一种纯粉。新鲜的溶于PBS 的工作液每天制备。

测定方法：100 微升含有E3G 的试验样品中加入50微升含有E3G / 葡萄糖氧化酶结合物（1 比50稀释）的PBS 和650 微克 / 毫升抗E3G 抗体。室温下孵育30分钟后，加入20微升固相悬液（1 毫克）至反应混合物中，再不断混合30分钟。此时，加入工作浓度的葡萄糖和过氧化氢酶（分别为150 毫摩尔和6000单位），在1.2 毫升PBS 中，再将全部样品转移至反应池中。

不断搅动反应池中样品，获得稳定状态的基本过氧化物水平。停止搅动，粒子固相沉积到包在电极的膜上。记录的信号是过氧化物产生率，用随意的单位表示，这些数值来自一个条形图记录器上的结果。为建立一标准曲线，在一定E3G 浓度范围内（从每毫升3 毫微克到1000毫微克）制备一系列样品。测定时每个样本有三个平行样品。

图5 说明所得结果。

实施例5

本实施例阐明粒子载体在一凝胶层上定位产生可测的过氧化氢讯号。这种测定是利用化学反应导致从胶层中放出可见光。当载体在样品中保持分散时，游离的过氧化氢酶用于破坏过氧化物和消除来自大量样品中的讯号。

一套小的密封的透明塑料样品管用作基本测试管。这种试管的精确大小并不重要，但常用大约1 厘米直径、3 厘米长。将小量（如0.15毫升）琼脂糖测定凝胶装入每个试管底部。

材料

固相：商业上提供的环氧活化的环氧乙烷丙烯珠（大小范围100-200 微米），用取自鸡蛋的抗生物素蛋白致敏。每10克干重珠用16毫克抗生物素蛋白。抗生物素蛋白连结珠可储于PH为7.1 的磷酸缓冲盐溶液（PBS）中。

结合物：来自商业系统的生物素化葡萄糖氧化酶是冻存干燥粉末，每毫克蛋白大约含有20毫微摩尔生物素。如介绍中那样此物需重新制备，用前立即稀释在PBST中。

生物素：d-生物素以结晶固体买自商业系统。正确称量生物素，溶于PBS 中作参考溶液，用此溶液为标准，稀释成适当浓度。其浓度有多种，如从5 毫微克 / 毫升至100 毫微克 / 毫升。

测定凝胶：在PH8.5 的Tris缓冲液中制备含1 % 琼脂糖的一定量凝胶。其中含有1.25毫摩尔鲁米诺和包被0.005 单位的辣根过氧化物酶。HRP 可买到，它包在聚酰胺微胶囊中（20-80 微米直径），每毫克湿固体含0.656 单位。胶囊膜是半渗透性的，允许小分子自由扩散，如过氧化氢，但保留分子量大于10,000的分子。

测定方法：离心抗生物素蛋白致敏珠样品，去除上清液。加入含

0.05% Keltrol 液的缓冲液，构成50/50 珠悬液。用贮存试剂在0.05%的Keltrol 缓冲溶液中制成每毫升溶液中含5 微克葡萄糖氧化酶生物素结合物溶液。每个微离心管中加入100 微升珠悬液，500 微升结合物和500 微升生物素溶液，每管加盖，室温下放在混均器上2 小时孵育后加入悬于2 毫升PBS 缓冲液的50微升珠，缓冲液中含1 毫克 / 毫升葡萄糖和约25单位 / 毫升的购得的牛肝过氧化氢酶。珠置于凝胶表面，如果含很少或没有游离的生物素，则从凝胶层中发出可见的蓝光。

实施例6

本实施例阐明化学荧光讯号的产生和在单克隆抗体测定中粒子载体物定位的应用。此种方法用于细胞培养液，如含单克隆抗体一类的免疫球蛋白。

材料

固相：商业系统获得大孔径聚苯乙烯粒子(Dyno:Dynospheres XP-6006)，平均大小为2.6 微米，其中有均匀分布的氧化铁。这些均匀的、球形珠是有羟乙基异丁烯酸，位于侧甲苯磺酰基衍生的外壳上。(甲苯磺酰基) 易用氨基进行亲核置换反应，导致表面含氨基的蛋白质固定。用购得的免抗小鼠单克隆抗体(E259,从Dako获得) 进行致敏。方法如下：

一定量含有Dynospheres xp-6006(10毫克) 悬液加到硼酸缓冲液中(0.005摩尔，PH9.5,0.5 毫升)。后加入羊IgG 溶液(200微克溶于1 毫升PBS 中，PH7.2)，再加入硼酸缓冲液(0.5 摩尔，用NaOH调PH至9.5, 0.5 毫升)。

在室温下置于轨道震荡器上过夜以发生结合。用一磁铁将珠况下，吸去蛋白液，用PBS (5 毫升) 洗一次。再重复一次结合操作，但这次是用BSA(20毫克) 以结合到其他未反应的甲苯磺酰基上。后将珠在磷酸缓冲液中洗涤过夜(0.25 摩尔 KH_2PO_4 ，用NaOH调PH至8 ，含有0.5%BSA

和0.1%吐温20,5毫升), 目的是除去吸附在珠表面的IgG。最后, 用相同的缓冲液(2×5 毫升) 洗涤珠, 再用PBS(2 ×5 毫升) 洗和贮存在已知体积的PBS 中, PBS 含有0.1%BSA 和0.01% 硫柳汞, 4 °C下保存。

结合物: 从商业系统购得羊抗小鼠IgG 单克隆抗体, 与辣根过氧化物酶偶合, 此酶为A6782 购自Sigma 公司。

分析样品: 抗 α HCG 小鼠单克隆免疫球蛋白, 在完全培养基(10%马血清 / HAZ)配成从0 至每毫升8 微克的标准浓度。

方法: 除被分析的样品外, 所有试剂溶于0.1 摩尔Tris/HCl PH8.6 的缓冲液中。20微升0.625%(容积浓度) 免抗小鼠致敏的磁粒悬液分散到试管中, 此管中同时有100 微升被分析物溶液和100 微升1/200 稀释的结合物。此混合物在室温下放在一标准的实验室振荡器上孵育30分钟。

后顺序加入下述试剂。

250 微升10毫摩尔鲁米诺。

250 微升5 毫摩尔对- 碘酚。

15微升市场上购得的黑色绘图墨水(选择其不干扰化学发光反应) 。

250 微升100 毫摩尔过氧化氢。

将管中内容彻底混均, 放一磁铁接近管底5 分钟, 使磁性固相定位于管底。再将管从磁铁上移去, 仔细放到光探测器内(不要使固定的粒子团移动) 。

光探测器装置主要特点在图6 中说明。这是一个横截面正面图。

此装置有一个直立的顶部开口的圆柱形套600, 内有一个光电倍增管601, 其窗602 与套600 的顶齐平并垂直向上。光电倍增管601 详细组成未画出。由于它与本发明无关。

安装于套600 顶部603 的是一扁平圆形片604 , 其直径与套600 相同。有一小圆孔605 穿过圆片604, 此孔位于光电倍增管601 窗602 的上面。圆片604 的下部表面606 刻有一水平沟, 它在圆片604 和圆柱形套

600 顶部603 之间留下一狭间隙，在其间隙中有一可移动的水平滑动的闸门608。闸门608 与装置外相通，可用手工打开或关闭。闸门608 处于开放位置。当完全插入时，则闸门608 挡住孔605，有效地阻挡住光线到达光电倍增管601 上的窗602。

安装在圆片604 上的是一圆体609，外径与套600 及圆片604 相同。它的垂直圆柱形轴与孔605 及光电倍增管601 的轴线相同。圆体609 内表面601 的直径大于孔605，它有一凹座611，能固定测量管612（见下面）。

圆形体609 和圆片604 用多个螺钉613 固定在圆柱套600 顶部（图上只画出一个螺钉）。螺钉从圆体609 的顶部614 向下延伸入圆套600。

一个能容易移动的遮光罩615 位于圆体609 的圆柱形套的顶部614。它的底缘616 与顶部614 内的圆形槽相接，以使透光罩能防止光进入凹座611。

如图6 所见，在圆体609 内的凹座611 被一圆底玻璃管612 占据，管中放入液体样品618 待测。管612 的底619 放在圆盘604 的孔上。颗粒固相载体物620 放在玻璃管612 的底619 上。在颗粒载体附近产生的化学发光玻管底的玻璃壁、圆盘604 上的孔605 直接到光电倍增管601 的窗上。

操作时，将所有分析试剂混合在管612 后，磁性粒子定位在管底，将管放进凹座611 内，盖上放在圆体609 上盖，测前将闸门608 打开如10秒钟，从光电倍增管上读数。

利用已知分析物浓度进行一系列实验，结果见下面表1，同样可以图形表示，见图7。下述高浓度分析物的结是由于“挂钩”（hook）效应。

表 1

分析物浓度	光读数
0(缓冲液)	2934
7.8	2641
15.6	6006
31.25	10608
62.5	19562
125	20302
250	21804
500	24330
1000	19806
2000	17393
4000	17220
8000	10310

图 1

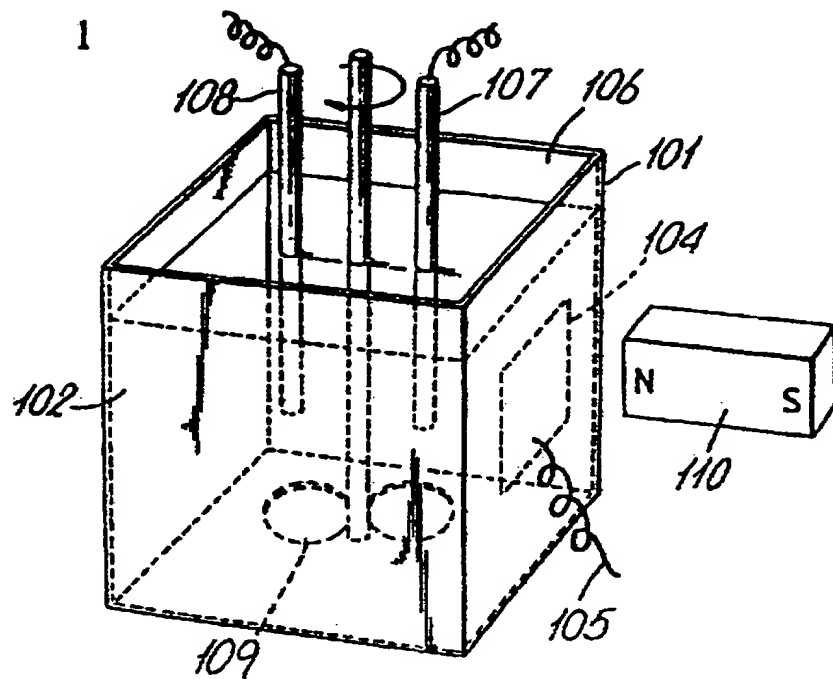
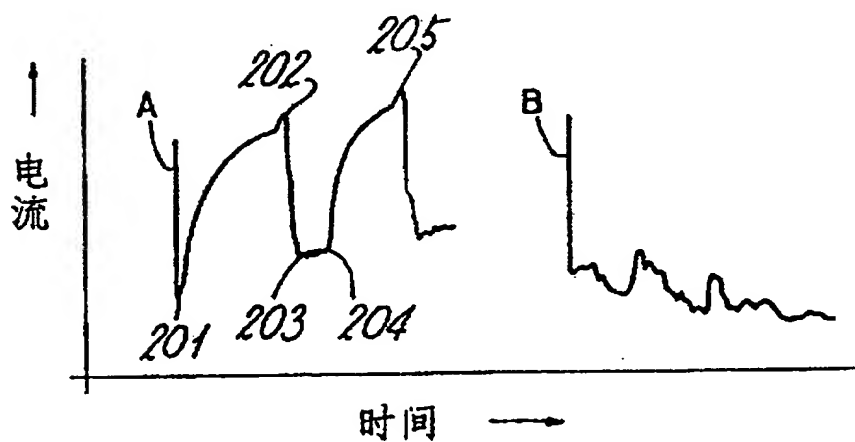


图 2



BEST AVAILABLE COPY

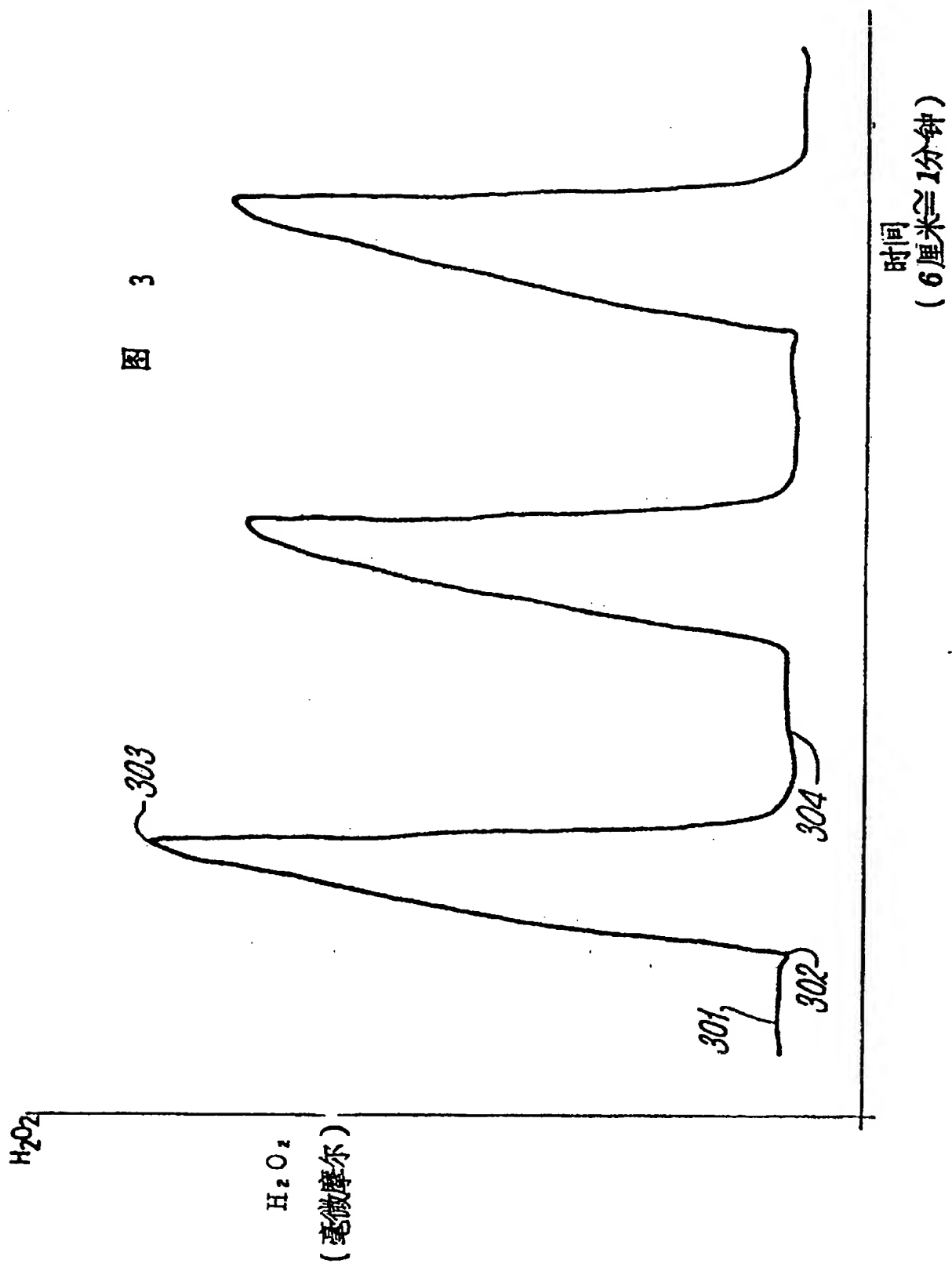
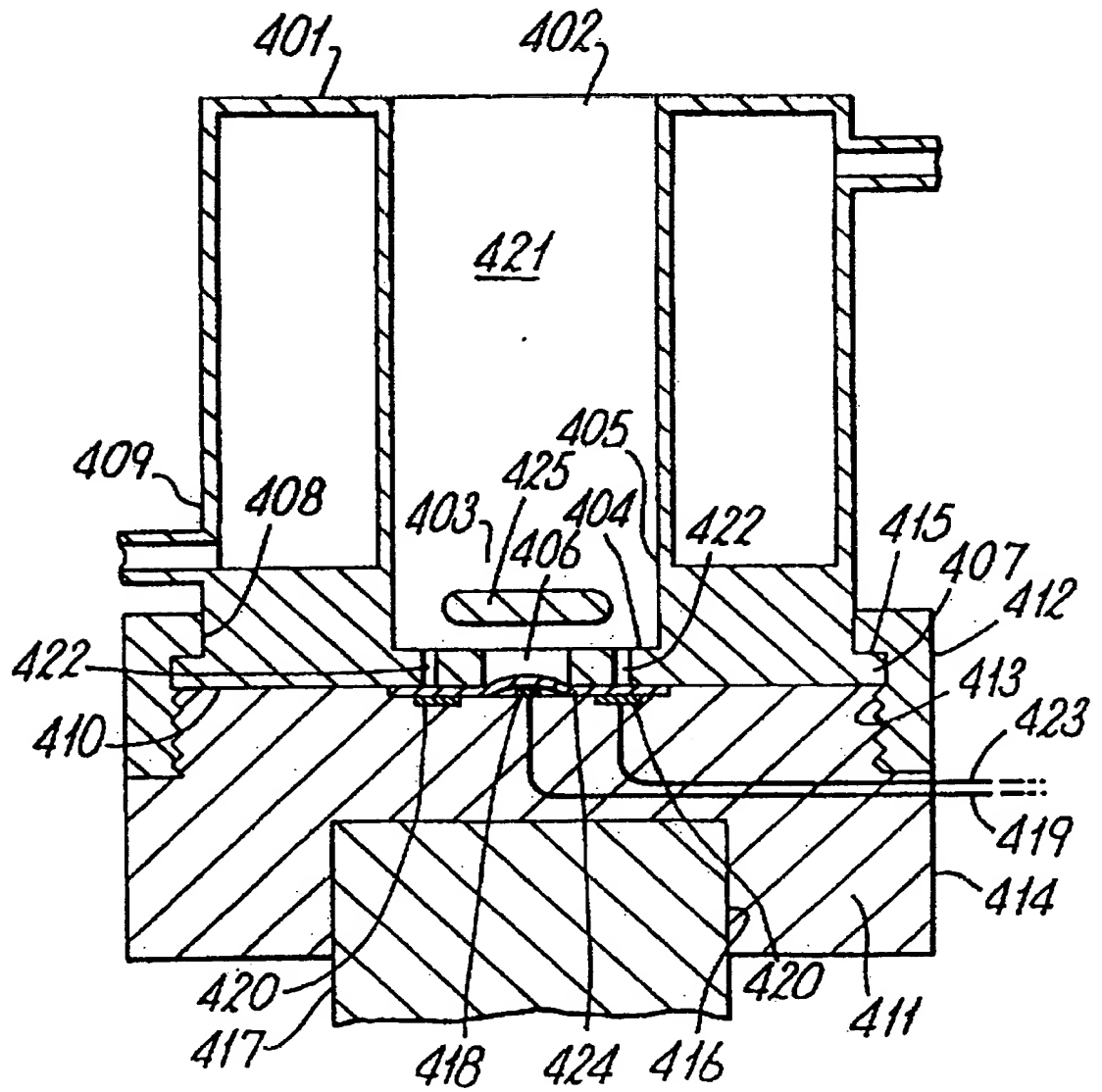


图 3

图 4



BEST AVAILABLE COPY

